

Fermentative Blutglukosebestimmung
mit Glukose-Oxydase

von

BERNHARD BUCKE

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. N. H e n n i n g

Fermentative Blutglukosebestimmung mit Glukose-Oxydase.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen



Vorgelegt von
Bernhard B u c k e
aus Bad Kösen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.

Dekan: Prof. Dr. N. H e n n i n g

Referent: Prof. Dr. N. H e n n i n g

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1958

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
A. Einleitung.....	4
B. Material und Methodik.....	9
C. Ergebnisse.....	12
1.) Herstellung der Eichkurve und Prüfung der Methode.....	12
2.) Bestimmung der Reaktionsbedingungen (Zeit, Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration).	12
3.) Bestimmung der Fermentkonzentration.....	13
4.) Blutzuckernormalwerte nach der GOD/POD- Methode.....	14
5.) Parallelbestimmungen mit der Methode nach HAGEDORN-JENSEN.....	14
6.) Hemmung der Fermentreaktion als Schnell- methode der Blutzuckerbestimmung.....	14
7.) Prüfung der Enteiweißungsmittel für das Blut.....	14
8.) Bestimmungen des Harnzuckers.....	14
9.) Berechnung der Fehlerbreite.....	15
D. Diskussion.....	16
E. Zusammenfassung.....	20
F. Literaturverzeichnis.....	33



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung.

=====

Zu Beginn dieses Jahrhunderts arbeiteten M a x i m o w (1), K o s t y t s c h e w (2) und J u n i t z k y (3) an Untersuchungen mit dem Preßsaft aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*. M a x i m o w (1) stellte Enzympräparate her, um den Gaswechsel, den diese Präparate hervorrufen, zu untersuchen. Er sagte damals, "daß Glukose in hohem Grade die Wirkung der Oxydase am *Aspergillus niger* steigere". Diese Untersuchungen wurden offenbar vergessen. Erst 1928 stellte M ü l l e r (4) bei weiteren Untersuchungen des Schimmelpilzes fest, daß das Glukose oxydierende Ferment andere Hexosen kaum oder gar nicht angriff. F r a n k e (5) (6) untersuchte dieses Enzym weiter und konnte es wesentlich anreichern. In der folgenden Zeit wurden verschiedene Glukose oxydierende Fermente beschrieben, nämlich das Notatin von C o u l t h a r d (7) (8) und das Penicillin B von v a n B r u g g e n (9). Es stellte sich schließlich heraus, daß es sich in jedem Falle um Glukose-Oxydase (GOD) handelte.

Von diesem Ferment werden nicht oxydiert (K e i l l i n (10)):

Fruktose	Methylierte Zucker
Arabinose	Methylglykoside
Fukose	Azetylglukose
Laktose	Phosphorylierte Zucker

Andere Zucker werden im Vergleich zur Glukose = 100 % oxydiert (10):

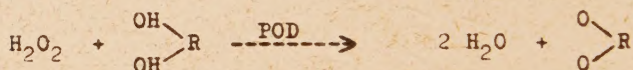
Mannose zu	0,98 %	Cellobiose zu	0,09 %
Maltose zu	0,19 %	Glukuronsäure zu	0,05 %
Galaktose zu	0,14 %	Galakturonsäure zu	0,05 %

In Gegenwart von molekularem Sauerstoff und Wasser oxydiert die Glukose-Oxydase β -Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxyd. α -Glukose wird nur zu 0,64 % (β -Glukose =

100 %) oxydiert. Allerdings sind die meisten GOD-Präparate noch mit Glukomutarotatase verunreinigt. Als Zwischenprodukt tritt Glukonolacton auf, das weiter hydrolytisch gespalten wird:



Durch Peroxydase (POD) und ein reduziertes Akzeptormolekül entstehen daraus 2 Moleküle Wasser und ein oxydiertes Akzeptormolekül:



K e i l l i n und H a r t r e e (10) verdanken wir die Bestimmung der wesentlichen Konstanten der Glukose-Oxydase. Bei ihren Untersuchungen fanden sie, daß das Ferment zwei deutliche Absorptionsmaxima hat und zwar bei 377 und 455 m μ . Diese Maxima weist die Leukoform nicht mehr auf, die bei Inkubation mit Glukose entsteht. Das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration liegt bei pH 5,6 - es reicht jedoch vom sauren (pH 3) bis in den Beginn des alkalischen Bereiches hinein. Eine Inaktivierung des Fermentes tritt erst bei pH 8 ein und wird durch Glukose verhindert. Die prosthetische Gruppe wurde von K e i l l i n (11) als Alloxazin-Adenin-Dinucleotid aufgeklärt, das Molekulargewicht wurde mit 149.000 bestimmt (12). Bei der Suche nach Fermenthemmern fanden F r a n k e und L o r e n z (5) die Narkotika als günstigste Substanzen. K e i l l i n und H a r t r e e (10) konnten bei Verwendung von reiner GOD diesen Effekt nicht feststellen. Sie prüften eine große Anzahl von Stoffen und konnten nur mit Oxychinon, Natriumnitrat und Semicarbazon eine Hemmung erzielen.

Die manometrische Technik, von K e i l l i n und H a r t r e e (13) angewendet, wobei der Sauerstoffzuwachs die Meßgröße darstellt, ist für die Routinearbeit zu auf-

wendig. Außerdem erfordert sie 0,1 - 0,2 mg Glukose pro Ansatz. Diese Menge liegt wesentlich über dem Blutquantum, das für die Bestimmung der Gesamtreduktion nach H a g e d o r n - J e n s e n (14) (15) erforderlich ist. In der Medizin war es andererseits von jeher wünschenswert, bei der Blutzuckerbestimmung wirklich nur die "wahre" Glukose zu erfassen. Bei der gewöhnlich angewandten Reduktionsmethode nach H a g e d o r n - J e n s e n (14) (15) entspricht die als "Blutzucker" bezeichnete Gesamtreduktion des Blutes im nüchternen Zustand einem Glukosewert von etwa 90 mg/100 ml. Die sogenannte Restreduktion macht etwa 10 - 20 mg/100 ml aus, so daß etwa 60 - 80 mg/100 ml "wahres" Kohlenhydrat vorhanden ist (L e h n h a r t z (16)). Bei der Restreduktion handelt es sich ebenfalls um reduzierende Nicht-Zuckersubstanzen: Kreatin 0,7 - 3,0 mg/100 ml, Kreatinin 1,0 - 1,5 mg/100 ml, Harnsäure 1,0 - 1,5 mg/100 ml, Hexosephosphorsäure 1,0 mg/100 ml, Ergothionein 0,5 - 2,5 mg/100 ml, Glutathion 5,0 mg/100 ml und Glukuronsäure (H i n s b e r g - L a n g (17)). Zur Ermittlung der Höhe der Restreduktion wurde die Reduktionskraft des Blutes vor und nach Vergärung der Glukose gemessen (G r a f e und S o r g e n f r e i (18)). Werte bis zu 30 mg/100 ml, gerechnet als Glukoseäquivalente, wurden dabei bei Gesunden gemessen. L o h m a n n (19) führte in neuerer Zeit mittels der Papierchromatographie Untersuchungen über die Höhe der Restreduktion bei Gesunden und Diabetikern durch. Er fand, daß 53 % der Diabetiker eine absolute Zunahme der Restreduktion gegenüber den Gesunden zeigten. Prozentual stieg die Restreduktion gegenüber dem Blutzucker jedoch nur in 17 % der Fälle bei Diabetikern an und zwar bis zu 100 mg/100 ml (in Glukoseäquivalenten). G e y (20) untersuchte bei Ratten papierchromatographisch den Blut- und Organzuckergehalt (s.Tab.I). Daraus resultiert, daß die Restreduktion in den meisten Fällen parallel zum Blutzucker ansteigt. Durch mehr oder weniger wirksame spezielle Enteiweißungsmethoden hat man

diese Fehler auszuschalten versucht. Dadurch wurden die bisherigen chemischen Bestimmungsverfahren kompliziert und zeitraubend. Lediglich die von P f l e i d e r e r (21) angegebene Methode verdient in dieser Hinsicht besondere Beachtung: Glukose und Adenosintriphosphat werden in Gegenwart von Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat und Adenosindiphosphat phosphoryliert. Adenosindiphosphat dient als vermittelnde Meßgröße, weil durch Anwesenheit von Pyruvat-Kinase und Phosphoenol-Brenztraubensäure Brenztraubensäure und Adenosintriphosphat gebildet wird. Die Brenztraubensäure-Konzentration wird schließlich als Meßgröße für die vorhanden gewesene Glukose benutzt und enzymatisch bestimmt.

Heute ist in den größeren klinischen Laboratorien die sehr brauchbare Methode zur Bestimmung der Gesamtreduktion im Blut nach H a g e d o r n - J e n s e n (14) (15) eingeführt. Voraussetzung bei dieser Methode ist eine tägliche Mindestzahl von Untersuchungen, da die verwendeten Reagentien nicht unbegrenzt haltbar sind. In der modernen klinischen Chemie treten auf der anderen Seite die kolorimetrischen Methoden gegenüber den titrimetrischen immer mehr in den Vordergrund, weil sie in der Handhabung einfacher und schneller sind. Bei der Methode nach B e n e d i c t (22) findet Phosphormolybdänsäure als Farbreagens Verwendung, die auch von F o l i n (23) benutzt wurde. Das entstehende Kuproxid wird nach Zusatz der Phosphormolybdänsäure kolorimetrisch bestimmt. H a s l e w o o d und S t r o o k m a n n (24) modifizierten diese Methode für kleine Blutmengen, da bei F o l i n (23) 0,1 - 0,4 ml notwendig sind. H o l z m a n n , M c A l l i s t e r und N i e m a n n (25) verwenden 1 %ige Karbazollösung und 82 - 84 %ige Schwefelsäure. Weiterhin finden α -Naphthol, Orzin, Diphenylamin, Resorzin und Indol als Farbstoffe Verwendung. All diesen Methoden haftet der gleiche Restreduktionsfehler an. Die dazu notwendigen Reagentien sind oft nicht genügend lange haltbar. Außerdem ist der Aufwand in chemischer und apparativer Hin-

sicht für Routinearbeit zu groß.

K e i l l i n (13) ging es bei seiner manometrischen Technik darum, den bei der Fermentreaktion anfallenden Sauerstoff im Inkubationsmedium zu fixieren.



Die Überlegungen und ersten Versuche von K e s t o n (26) und T e l l e r (27) verfolgten den gleichen Weg, und zwar den durch die Peroxydase freigesetzten Sauerstoff durch Koppelung an eine oxydationsfreudige Verbindung sichtbar zu machen. Sie wendeten dazu das o-Dianisidin an, das reduziert farblos ist, oxydiert eine orange-braune Farbe zeigt und kolorimetrisch ausgewertet werden kann. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt in dem Bereich von 420 - 470 mμ (s.Tab.II).

Die als "Clini-Test" (WZ) und "Gluko-Test" (WZ) im Handel erhältlichen Testblättchen für die halb-quantitative Harn-glukosebestimmung sind die einfachsten Vorläufer dieses Prinzips. Für die Blutzuckerbestimmung, als ausgeprägte Mikroreaktion, galt es in dieser Arbeit zuvor einen großen Teil wesentlicher Einzelfragen zu klären. Insbesondere kam wegen der deutschen Arbeitsgepflogenheit, für die Blutzuckerbestimmung Kapillarblut zu verwenden, von vornherein nur eine Methode in Frage, die dieser Gegebenheit gewachsen war. H u g g e t t und N i x o n (28) berichteten bisher über die Untersuchungen mit Venenblut.

B. Material und Methodik.

=====

1.) Blutzuckerbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN (14) (15).

Bei den Parallelbestimmungen wurde die titrimetrische Bestimmung des Blutzuckers nach H a g e d o r n - J e n - s e n (14) (15) verwendet. Die Enteiweißung geschieht durch unmittelbar vor Gebrauch in Reagensgläser pipettierte 1 ml 0,4 %ige Natronlauge und 5 ml 0,45 %ige Zinksulfatlösung, in die 0,1 ml Kapillarblut in Doppelbestimmung gegeben werden. Nach kurzem Schütteln wird die Lösung zur Verhinderung der Glykolyse sofort 3 Min. gekocht und anschließend in bereitstehende Gläser mit 2 ml 0,005 n $K_3(Fe(CN)_6)$ filtriert. Filter und Reagensgläser werden mit Aqua dest. nachgewaschen. Das mit Kaliumferricyanidlösung versetzte Filtrat wird 15 Min. im Wasserbad gekocht. Parallel läuft ein in gleicher Weise ohne Blut angesetzter Leerwert in Doppelbestimmung. Nach rascher Abkühlung setzt man 2 ml Kaliumjodid-Zinksulfatlösung, 2 ml Essigsäurelösung und 2 Tropfen Stärkelösung hinzu. Die Titration geschieht mit 0,005 n Thiosulfatlösung bis zum Verschwinden der Blaufärbung. Die Berechnung ist nach Abzug des Leerwertes aus den üblichen Tabellen möglich.

2.) Herstellung der Fermentlösung.

25 mg Glukose-Oxydase, 1,0 mg Peroxydase und 0,5 ml 1 %iges gereinigtes (Reinigung durch Umkristallisation mit Äther und Tierkohle) o-Dianisidin (unter Erwärmung in Äthylalkohol gelöst) werden mit 0,06 m Phosphatpuffer (pH 7,0) auf 100 ml aufgefüllt und in einer braunen Flasche bei 4°C im Eisschrank aufbewahrt. Eventuelle Trübungen sind durch Filtration (Schleicher & Schüll Nr. 588 F) zu entfernen. Die Haltbarkeit der Lösung beträgt etwa 2 Wochen. Eine leichte Braunfärbung, durch die Autoxydation des o-Dianisidins bedingt, wird durch den stets mitlaufenden Leerwert korrigiert.

3.) Herstellung der Glukose-Standard-Lösung.

100 mg Glukose werden in 100 ml 0,25 %iger Benzoesäure zur Konservierung gelöst und in einer dicht verschlossenen Flasche aufbewahrt. 0,1 ml dieser Lösung enthalten dann 100 μ g Glukose, die als Standardwert in Doppelbestimmung mitlaufen.

4.) Enteiweißung.

Die Enteiweißung des 0,1 ml entnommenen Blutes geschieht durch 0,5 ml 10 %ige Trichloressigsäure.

5.) Durchführung.

0,1 ml Blut werden mit einer Kapillarpipette nach Desinfektion und Entfettung der Einstichstelle aus dem Ohrfläppchen oder der Fingerbeere entnommen und sofort in ein konisches Zentrifugenglas, das 0,5 ml der 10 %igen Trichloressigsäure enthält, gegeben. Es kommt sofort zu einer braunflockigen Eiweißfällung. Nach kurzfristigem Zentrifugieren (3-5 Min.) bei 3000 Umdrehungen/Min. werden 0,2 ml der überstehenden klaren Flüssigkeit abgehebert und in vorbereitete Reagensgläser mit je 5,0 ml Fermentlösung gegeben und durch Umschwenken gemischt. Gleichzeitig werden ein Leerwert mit 0,1 ml Aqua dest. und der Kontrollwert in Doppelbestimmung mit der Glukose-Standardlösung in gleicher Weise angesetzt. Nach 35-40 Min. Stehen bei Zimmertemperatur (20-22° C) werden die Extinktionen in einer quadratischen 1 cm Schicht-Cuvette bei 420 m μ in einem Spektralphotometer oder durch Verwendung des Filters S 42 im Elko II bestimmt.

Mit dieser Methode können Glukose-Mengen bis zu 150 μ g im Ansatz bestimmt werden. Da von 0,6 ml Substratmenge nur 0,2 ml entnommen werden, entsprechen diese 450 mg% Blutzucker. Bei noch größeren Glukosemengen läuft die Fermentreaktion zwar weiter, aber der Indikatorfarbstoff fällt aus.

6.) Schnellmethode.

In dringenden Fällen können die Extinktionen schon früher bestimmt werden. Voraussetzung dafür ist die Verwendung eines gereinigten o-Dianisidins, da nur dadurch der schnelle Reaktionsablauf gewährleistet ist. Genau 10 Min. (mit der Stoppuhr bestimmt!) nach Zusatz der Fermentlösung wird die Reaktion durch Zugabe zweier Tropfen konzentrierter Salzsäure gehemmt. Dabei schlägt der orange-braune Farbton in einen gelb-grünlichen um, so daß dann sofort die Extinktionen in üblicher Weise bestimmt werden können.

7.) Berechnung.

Um Störungen durch Veränderungen der Fermente, der Temperatur und der sonstigen subjektiven und apparativen Fehler auszuschalten, werden bei jedem Analysengang 2 Glukose-Standardwerte mit 100 μ = 100 mg% Glukose im Ansatz mitgeführt. Das Extinktionsmittel dieser Kontrollen dient als Berechnungsgrundlage. Die Ablesung im Spektralphotometer geschieht nach Einstellung des Leerwertes auf 100 %, wobei die Extinktion gleich 0 ist. Die Berechnung erfolgt dann nach der Formel:

$$\frac{\text{Extinktion des Meßwertes}}{\text{Extinktionsmittel des Standardwertes}} \times \text{Konzentration der Standardlösung} \times F = \text{mg\% Glukose}$$

$$\text{Beispiel: } \frac{0,291}{0,100} \times 100 \times 1 = 291 \text{ mg\% Glukose}$$

F: Korrekturfaktor für Änderungen der Schichtdicke oder der Konzentration.

- 1.) Für die hier angegebene Konzentration (0,2 ml Zentrifugat von 0,6 ml Gesamtvolumen: Endvolumen = 5,2 ml) und Schicht (1,0 cm) : F = 1.
- 2.) Für Verdoppelung des Volumens (10,2 ml Volumen) oder Halbierung der Schichtdicke (0,5 cm) : F = 2.

C. Ergebnisse. =====

1.) Bei der Herstellung der Eichkurve wurde eine Glukose-lösung, mit Benzoesäure stabilisiert, verwendet. Entsprechend den Mengenverhältnissen bei der Blutzuckerbestimmung enthielten jeweils 0,2 ml Lösung steigende Konzentrationen von 0 - 150 μ . Die Eichkurve folgt dem Lambert-Beer'schen Gesetz, es besteht also ein lineares Verhältnis zwischen Extinktion und Glukose-Konzentration sowie Glukose-Konzentration und Schichtdicke.

Abbildung 1

Verwertbare Ergebnisse im Sinne der linearen Farbentwicklung konnten bei Verwendung des ungereinigten Farbstoffes erst ab 20 μ festgestellt werden. Nach dessen Reinigung wurde auch im Bereich von 0 - 20 μ Linearität bewiesen, so daß die Eichkurve nach der endgültigen Methode von 0-150 μ entsprechend 0-150 mg% linear verläuft. Oberhalb dieser Grenze biegt die Eichkurve um, da das Fermentgemisch wohl noch größere Mengen Glukose erfassen kann, aber das oxydierte o-Dianisidin aus der Pufferlösung ausfällt. Zugaben von organischen Lösungsmitteln (50 %iger Äthylalkohol, Aceton und Dioxan) verbessern die Löslichkeit nicht.

Zur Prüfung dieser neuen Methode zur Blutglukosebestimmung wurden folgende Versuche angestellt:

Besonders hergestellte Glukoselösungen, bzw. eine Testlösung Labtrol (Dade Reagents, INC., Miami Florida, No LT-15-DD) wurden untersucht (s.Tab.III).

Weiterhin konnten Glukosemengen, die bei den Blutzuckerbestimmungen zugefügt wurden, wiedergefunden werden (s.Tab.IV).

2.) Für die Fermentreaktion waren weiterhin die besten Reaktionsbedingungen zu ermitteln. Die erforderliche Wasserstoffionenkonzentration wurde im wesentlichen nach dem pH-Optimum der Peroxydase gewählt, das bei pH 7,0 liegt. Die

Glukose-Oxydase weist zwar ihr Maximum bei pH 5,6 auf; sie ist jedoch in einem relativ breiten Bereich noch ausreichend wirksam. Es wurde ein Phosphatpuffer Merck Titrisol (Nr.9887) 0,06 m verwendet.

Die Farbentwicklung wurde bei verschiedenen Temperaturen, und zwar in einem Bereich von 6-50° C kontrolliert. Das Optimum konnte bei einer Temperatur von 37° C ermittelt werden. Nach Verwendung des gereinigten o-Dianisidins (s.Tab.V) war eine Inkubation im Wasserbad nicht mehr notwendig, da die Reaktion bei Zimmertemperatur das Optimum der Farbentwicklung erreicht.

Tabelle VI

Die Fermentreaktion bedurfte einer Inkubationszeit von 60 Minuten.

Abbildung 3

Die Konstanz der Farbe wurde stundenweise kontrolliert. Erst nach 5 Stunden kam es zu erniedrigten Extinktionen durch Ausfall des Farbstoffes in feinflockiger Form.- Der gereinigte Farbstoff ermöglicht eine kürzere Reaktionszeit von 35 - 40 Minuten (s.Tab.VII). Außerdem wurde damit eine Farbkonzanz bis zu 48 Stunden erreicht.

Abbildung 4

3.) Die Prüfung der Fermentkonzentration an Glukose-Oxydase und Peroxydase sollte unter dem Blickpunkt des Abstimmens der besten Wirkung mit der Wirtschaftlichkeit geschehen. Es wurden jeweils Versuche mit einer konstanten Menge des einen Fermentes und verschiedener Konzentrationen des anderen Fermentes gemacht. Bei der endgültigen Methode werden 25 mg gereinigte GOD und 1 mg POD in 100 ml verwendet.

Tabelle VIII und IX

4.) Die bei den Routinebestimmungen gefundenen Normalwerte liegen im Bereich von 50 - 90 mg/100 ml.

5.) Parallelbestimmungen der GOD - POD Reaktion wurden mit der Methode zur Blutzuckerbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN durchgeführt. Sie brachten die erwarteten Ergebnisse.

Tabelle X

6.) Zur Hemmung der Fermentreaktion zum Zwecke einer Schnellbestimmung des Blutzuckers war einmal ein möglichst reiner Farbstoff erforderlich, zum anderen wurden verschiedene Konzentrationen von Salzsäure verwendet und die kürzest mögliche Zeit der Inkubation ermittelt. Eine Hemmung ist nach 10 Minuten von Reaktionsbeginn an gerechnet möglich und zwar mit 2 Tropfen konzentrierter Salzsäure (s.Tab.XI). Der orange-braune Farbton des Reaktionsgemisches geht dabei in einen gelb-grünlichen über (s.Tab.XII).

7.) Die Enteiweißung des Blutes wurde mit Äthylalkohol, mit einer Methode nach S o m o g y (29) und Trichloressigsäure bzw. Perchlorsäure durchgeführt. Bei der Enteiweißung mit Äthylalkohol zeigte die überstehende Flüssigkeit einen bräunlichen Farbton, beim Ansatz nach S o m o g y , der wegen der größeren Endvolumenmenge angewendet wurde, trübten sich die Standardwerte während der Fermentreaktion. Aus dem gleichen Grund versuchte niedrige Säurekonzentrationen genügten ebenfalls nicht. Als optimal wurde schliesslich eine 10 %ige Trichloressigsäure zur Enteiweißung ermittelt.

8.) Zur Harnglukosebestimmung wurde der Urin mittels Kohlefilter weitgehend entfärbt. Nach Verdünnung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:500 wurde der Ansatz entsprechend der

Blutzuckermethode hergestellt. Die Bestimmungen wurden durch die Polarisation und die GOD / POD - Methode in Parallelversuchen durchgeführt (s.Tab.XIII).

9.) Die Fehlergrenze der Methode liegt bei $\pm 4 \%$. Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x' - x)^2}{N - 1}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (0,125 - 0,119)^2}{10 - 1}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(0,006)^2}{9}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{0,000.036}{9}}$$

$$\sigma = \sqrt{0,000004}$$

$$\sigma = 0,002$$

σ = Standard Abweichung
 x' = Mittelwert
 N = Anzahl der Einzelbestimmungen

$\sum$ = Summe von
 x = Einzelbestimmung

$$\text{Fehlergrenze} = \frac{3 \times 100}{x'} = a \%$$

$$\frac{3 \times 0,002 \times 100}{0,125} = \pm 4 \%$$

D. Diskussion.

=====

Zur Durchführung dieser Blutglukosebestimmung waren zur Herstellung einer Eichkurve und als Standardlösung für die Routinebestimmung konstante Glukoselösungen notwendig. Es wurde die reine Glukose DAB 6 nach Trocknung im Exsikkator verwendet und zwar eingewogen unter Berücksichtigung der Tatsache, daß ein Mol Glukose $1/2$ Mol H_2O enthält, was 5 % entsprechen würde. Der Gefahr der Zersetzung der Glukose durch Bakterien wurde durch Lösung in Benzoesäure begegnet.

Nach Versuchen mit Pyrogallol, Kongorot und N,N-dimethyl-p-phenylendiamin wurde wie bei H u g g e t t und N i x o n (28) o-Dianisidin als oxydationsfreudige Verbindung benutzt. Dabei traten Schwierigkeiten auf, die sich erst nach Reinigung des Farbstoffes aufklärten und eine Verbesserung der Methode ermöglichten. Mit dem ungereinigten o-Dianisidin war der lineare Verlauf der Eichkurve erst ab 20 μ zu erreichen. Für die Reaktion war eine Inkubation im Wasserbad bei 37° C für eine Zeit von 60 Minuten notwendig. Auch die Entwicklung einer Schnellmethode scheiterte. Durch mehrfache Umkristallisation mittels peroxydfreiem Äther und Tierkohle konnten aus dem braun-violetten Farbpulver (Schmelzpunkt: 112-114°C) nahezu farblose Kristalle (Schmelzpunkt: 122°C) gewonnen werden, die sich unter Erwärmung im Wasserbad mit Äthylalkohol lösen lassen. Ein weiterer Vorteil dieses Farbstoffes ist im Gegensatz zu dem von M i d d l e t o n und G r i f f i t h (30) verwendeten o-Tolidin, daß die Farbe nach Abschluß der Reaktion für maximal 48 Stunden konstant bleibt und nicht nur 10 Minuten (30).

Zur Enteiweißung schieden starke Säuren und schwermetallhaltige Fällungsmittel aus den zur Wahl stehenden Möglichkeiten von vornherein aus. Orientierende Versuche mit Äthylalkohol ließen einige Vorzüge erkennen. Eine etwaige Glykolyse wurde durch den entwässernden Effekt sofort unterbrochen. Weiterhin hatte der Alkoholzusatz einen fördernden Einfluß auf die

Extinktion der resultierenden Farbe, verglichen mit demselben Ansatz ohne Äthylalkohol (s. Abb. 1). Der zugesetzte Alkohol hat hierbei offenbar die Löslichkeit des oxydierten o-Dianisidins verbessert. Bei der serienmäßigen Bestimmung stellte sich jedoch heraus, daß der Enteiweißung mit Alkohol verschiedene Nachteile anhaften. Einmal findet eine unkontrollierbare Volumenkontraktion statt, und zum anderen ist das Zentrifugat schwach bräunlich gefärbt, da der Alkohol offenbar eine Farbkomponente aus dem Blut löst. - Die Enteiweißung des Blutes nach S o m o g y (29) hatte den Vorteil einer größeren Volumenmenge, was die Routinearbeit wesentlich erleichtert hätte. Außerdem erübrigte sich durch die hierbei geübte Filtration das Abhebern des überstehenden Zentrifugates. Es wurde 1 ml des Filtrates mit 2,5 ml Reagens versetzt. Bei Beobachtung des Kontrollwertes zeigte sich jedoch eine Trübung. Wahrscheinlich bringt die Natronlauge das Zinksulfat beim Nichtvorhandensein von eiweißhaltigen Substanzen nicht vollständig zum Niederschlag. Dadurch kommt es zur Erhöhung der Salzkonzentration und damit zur Veränderung des pH-Wertes. Die Anwendung von 1 %iger Trichloressigsäure - ebenfalls mit der Absicht, ein größeres Endvolumen zu haben - führte lediglich zur Hämolyse des Blutes und reichte nicht zur Eiweißfällung aus. Es wurde schließlich 10 %ige Trichloressigsäure zur Enteiweißung des Blutes bei dieser Methode angewendet.

Beim Vergleich zweier Phosphatpuffer, dem nach Sørensen und dem Titrisol-Puffer Merck, erwies sich der schwächere Merck-Puffer als günstiger, vor allem bei den Versuchen mit der Enteiweißung nach S o m o g y , wobei es durch die hohe Salzkonzentration relativ schnell zum Ausfall des Farbstoffes und damit zur Trübung der Lösung kam.

Die Farbentwicklung wurde mit dem ungereinigten Farbstoff bei verschiedenen Temperaturen geprüft. Sie war am günstigsten bei 37° C (s. Tab. VI). Nach einstündiger Inkubation war die Reaktion abgeschlossen (s. Abb. 3). Temperaturen von 60° C

zerstörten die Fermente. Das Ablesen der Extinktionen vor Ablauf einer Stunde war nicht möglich, da die Reaktion auch bei Zimmertemperatur verlangsamt weiterlief, so daß sich also ständig höhere Werte ergeben hätten. Mit gut gereinigtem o-Dianisidin setzte die Reaktion schnell ein und ist schon nach 35 - 40 Minuten beendet. Es genügt dabei eine Zimmertemperatur von 22° C.

Außer physikalischen Faktoren und pH-Änderungen vermag eine große Zahl chemischer Faktoren die Aktivität eines Enzyms zu hemmen. Mit der Hemmung der Glukose-Oxydase beschäftigten sich Frank e und Loren z (5). Sie hatten bei ihren Versuchen Erfolge mit Narkotika (Alkohol, Urethan), die als Dehydrase-Hemmer bekannt waren. Ke il l i n und H a r t r e e (10), die reine Glukose-Oxydase verwendeten, konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Ebenfalls gelang ihnen keine Hemmung mit Atemgiften (HCN , H_2S , HN_3), wie es M ü l l e r (4) beschrieben hatte. Sie testeten eine große Anzahl von Stoffen, erreichten jedoch nur in einigen Fällen eine Hemmung und zwar mit Oxychinon, Natriumnitrat und Semicarbazon. Durch den raschen Reaktionsablauf ist eine Hemmung der Reaktion am besten mit 2 Tropfen konzentrierter Salzsäure möglich. Schon nach 10 Minuten ist die Farbentwicklung stark genug, so daß die Extinktionen bestimmt werden können. Es ist damit eine schnelle Blutzuckerbestimmung in dringenden Fällen möglich. Eine große Anzahl gleichzeitiger Untersuchungen gestattet diese Schnellmethode nicht, da die Zeit für jeden Wert mit der Stoppuhr exakt bestimmt werden muß.

Die Fermentkonzentrationen sollten aus wirtschaftlichen Gründen möglichst niedrig gehalten werden, jedoch unter gleichzeitiger Berücksichtigung der besten Wirksamkeit. Zu Beginn der Versuche kamen sowohl die Peroxydase als auch die Glukose-Oxydase der Firma Boehringer zur Anwendung. Letztere war durch Fremdeiweiße verunreinigt, so daß die weiteren Versuche mit GOD (Worthington-Corp.) durchgeführt wurden. Es ergaben sich dabei als günstigste Fermentkonzentrationen 125 mg GOD

und 0,5 mg POD in 100 ml (s.Tab.VIII und IX). Vor Beendigung der Arbeit kam dann jedoch die gereinigte GOD (Boehringer) zur Anwendung. Es wurde bei der endgültigen Methode die Fermentkonzentration auf 25 mg GOD und 1,0 mg POD abgestimmt.

Zur etwaigen Anwendung dieser Methode bei der Bestimmung des Harnzuckers wurden folgende Versuche durchgeführt: nach Enteiweißung des Harnes und Entfärbung mit Tierkohle wurde dieser mit Aqua dest. verdünnt. Infolge der hohen Konzentrationen war eine Verdünnung von mindestens 1:500 notwendig. Dann ließen sich die Bestimmungen wie beim Blutzucker durchführen. Diese große Verdünnung erhöht die Fehlerbreite jedoch wesentlich. Außerdem ist die Bestimmung der Harnglukose mittels der Polarisation dann ebenso genau, schneller und in der Durchführung einfacher. Die fermentative Bestimmung würde lediglich zur Abgrenzung einer Fruktosurie und Galaktosurie oder aber zur qualitativen Bestimmung, wie schon im "Clini-Test" (WZ) oder "Gluko-Test" (WZ) vorhanden, lohnend anwendbar sein.

E. Zusammenfassung.

=====

Es wird über eine kolorimetrische Methode der Blutzuckerbestimmung im Kapillarblut berichtet, wofür ein Fermentgemisch von Glukose-Oxydase und Peroxydase sowie o-Dianisidin als Sauerstoffakzeptor Verwendung finden. Der Vorzug dieser Methode liegt neben der relativ einfachen und billigen Durchführung in der Spezifität der Reaktion, so daß die Bestimmung des wahren Blut-Glukosegehaltes möglich ist. Die Methode ist von 0 - 450 mg % entsprechend 0 - 150 μ im Ansatz anwendbar.

Eine Schnellmethode durch Hemmung der Fermentreaktion mittels zweier Tropfen konzentrierter Salzsäure nach 10 Minuten ermöglicht darüber hinaus die Blutzuckerbestimmung bei dringenden Fällen in etwa 20 Minuten von Beginn der Blutentnahme an.

Die Verwendung des Fermentgemisches zur Bestimmung des Harnzuckers ist wegen der großen Fehlerbreite durch zu große Verdünnung und zu lange Dauer gegenüber der polarimetrischen Bestimmung nicht vorzuziehen, es sei denn zur Abgrenzung einer Fruktosurie oder Galaktosurie.

Die lineare Entwicklung der Farbe mit steigenden Glukosekonzentrationen in 0,2 ml Lösung + 2,5 ml Reagens. Inkubationszeit 60 Minuten bei $37 \pm 2^\circ \text{C}$. Schicht 1 cm. Die Mengenangaben f /Ansatz können wegen der Verdünnung (1:1000) als $\text{mg}/100 \text{ ml}$ Blut abgelassen werden.

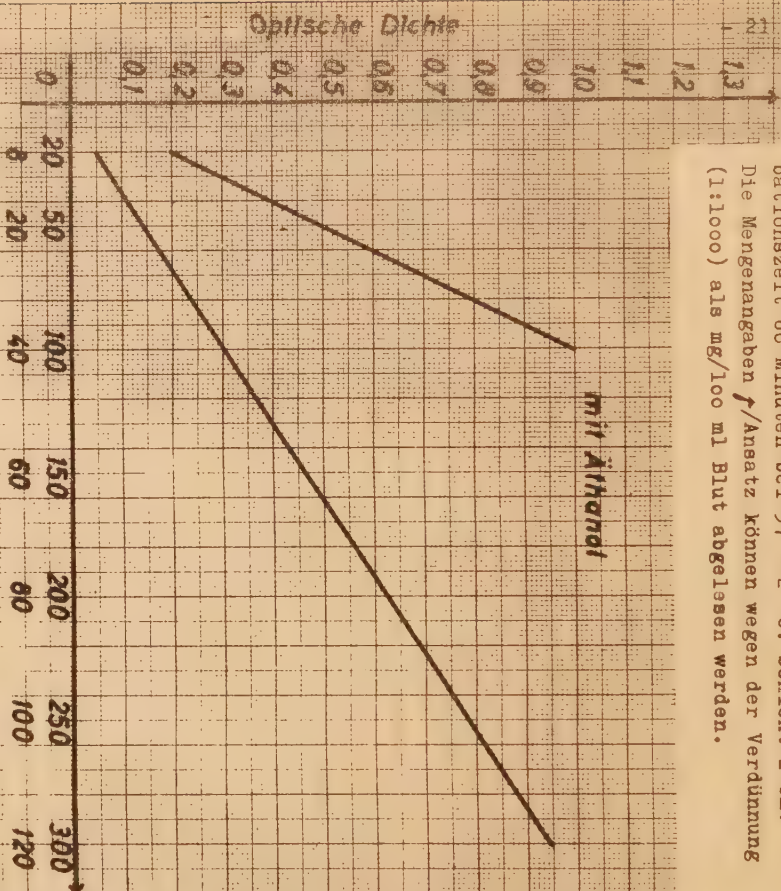


Abb. 1

mg per 100 ml Glukose im Ansatz
x Glukose in der Probe

Die lineare Entwicklung der Farbe mit steigenden Glukosekonzentrationen in 0,1 ml Lösung + 5,0 ml Reagens unter Verwendung des gereinigten o-Dianisidins.

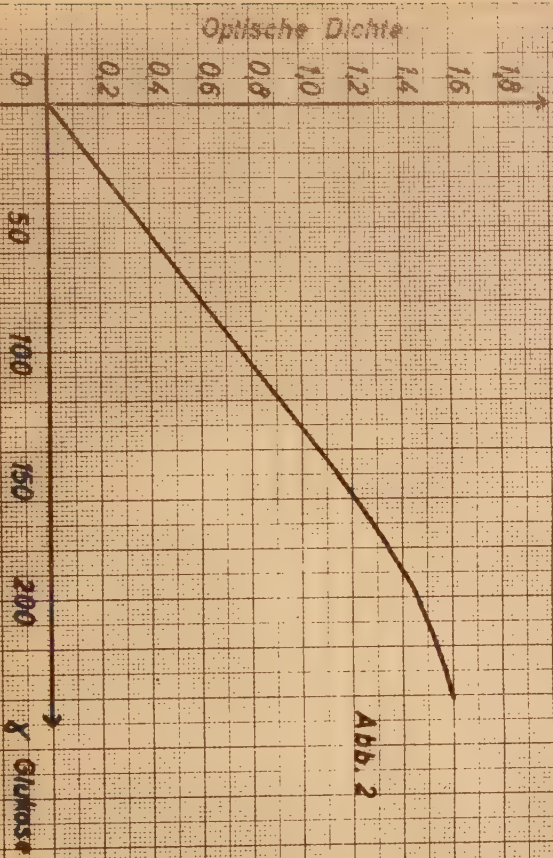
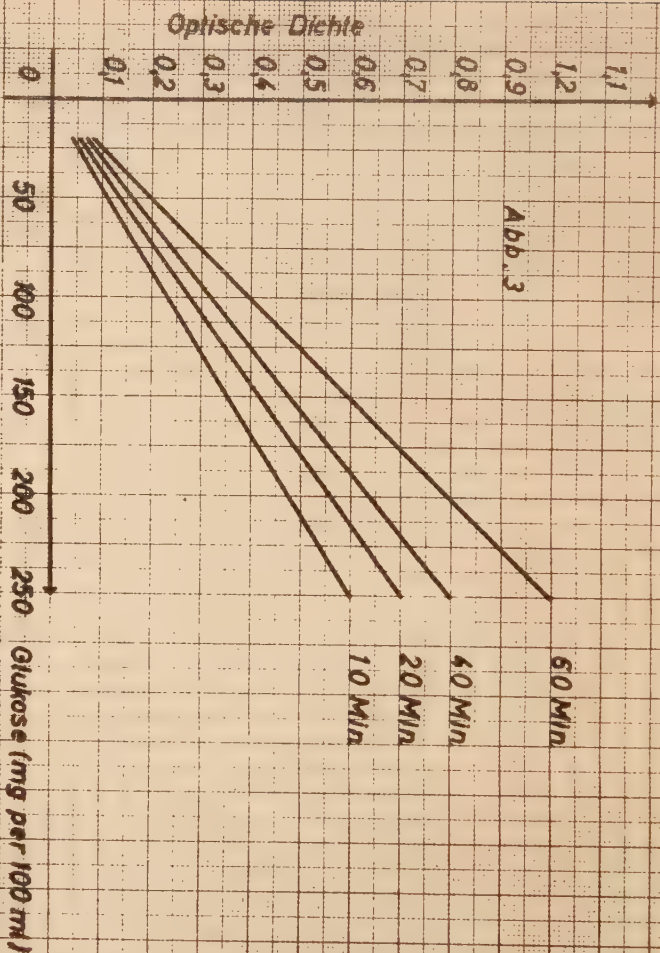


Abb. 2

0,04 ml Glukoselösung mit steigender Konzentration unter Zusatz von 0,16 ml Äthylalkohol und 2,5 ml Reagens. Inkubationszeit 10 bis 60 Minuten bei $37 \pm 2^\circ \text{C}$. Schicht 1 cm.

Wirkung verschiedener Inkubationszeiten auf die Farbentwicklung

Abb. 3



Konstanz der Farbe

Abb. 4

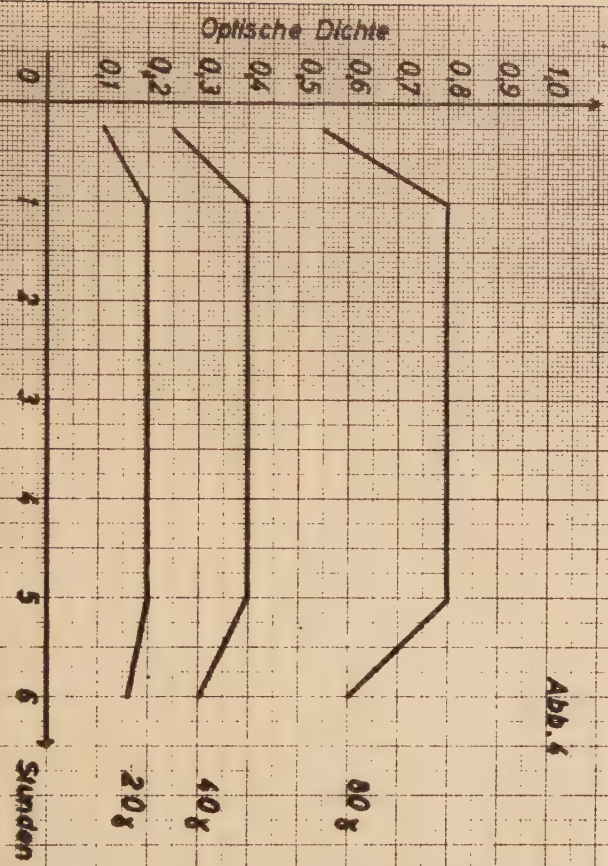


Tabelle I

Ratte Nr.	Gesamtreaktion (mg/100 ml)	Glukose (mg/100 ml)	Glukose (% der Gesamtreaktion)
28	61	59	97
10	82	67	82
8	76	71	93
12	111	85	77
30	124	110	89

Die Gesamtreaktion und die wahre Glukose im
Blutplasma der Ratten.

Tabelle II

Wellenlänge in m μ	Extinktion	Wellenlänge in m μ	Extinktion
205	0,13	400	0,25
210	0,14	410	0,28
220	0,10	420	0,31
230	0,10	430	0,31
235	0,10	440	0,32
240	0,09	450	0,33
250	0,09	460	0,33
300	0,11	470	0,32
350	0,17	480	0,32
380	0,19	500	0,29
390	0,21	550	0,17

Absorptionsspektrum des ungereinigten o-Dianisidins
(Spektralphotometer Zeiß-Opton, MQ 4, 1 cm Schichtdicke).

Tabelle III

	theoret. Wert in mg/100 ml	gefundenen Wert in mg/100 ml	Mittelwert in mg/100 ml	% Abwei- chung	
Glukose- lösung I	238,0	241,6	238,4	240,0	1,008 %
Glukose- lösung II	161,0	161,4	158,6	160,0	1,006 %
Laktrol	112,0	112,0	116,0	114,0	1,017 %

Prüfung der Methode durch Untersuchung verschiedener
Testlösungen.

Tabelle IV

Gesamtblut mg/100 ml	theoret. Wert (Ges. Blut + 100 mg/100 ml Glukose)	gefundener Wert in mg/100 ml	Mittelwert in mg/100 ml	% Abwei- chung	
98	198	192,2	197,8	195,0	1,015 %
170	270	274,0	276,0	275,0	1,018 %
125	225	219,6	225,6	222,6	1,011 %
215	315	308,6	309,4	309,0	1,019 %
119	219	220,0	225,6	222,8	1,017 %

Nachweis von zugefügten Glukosemengen zur Prüfung der Methode.

Tabelle V

Wellenlänge in m μ	Extinktion	Wellenlänge in m μ	Extinktion
205	0,23	400	0,42
210	0,24	410	0,47
220	0,20	420	0,52
250	0,22	430	0,54
275	0,24	450	0,56
300	0,15	400	0,56
310	0,04	470	0,54
330	0,09	500	0,46
340	0,23	550	0,26
350	0,26	600	0,13
370	0,28	650	0,11
390	0,37		

Absorptionsspektrum des gereinigten o-Dianisidins
(Spektralphotometer Zeiß-Opton, MQ 4, 1 cm Schichtdicke).

Tabelle VI

mg Glukose per 100 ml	6° C	11° C	22° C	37° C	50° C
50	0,13	0,14	0,18	0,20	0,10
100	0,27	0,29	0,36	0,40	0,20

Wirkung der verschiedenen Temperaturen auf die Farbent-
wicklung (0,04 ml Glukoselösung mit steigender Konzentra-
tion unter Zusatz von 0,16 ml Äthylalkohol und 2,5 ml
Reagens. Inkubationszeit 60 Minuten bei 37 $\pm$ 2° C.
Schicht 1 cm).

Tabelle VII

↑ -Glukosemenge im Ansatz	Extinktion nach 40 Minuten		Extinktion nach 60 Minuten	
5	0,019	0,020	0,021	0,021
10	0,041	0,041	0,043	0,042
20	0,120	0,119	0,128	0,121
40	0,229	0,230	0,224	0,229
50	0,301	0,300	0,298	0,300
70	0,396	0,395	0,395	0,410
100	0,541	0,541	0,540	0,544

Verkürzung der Reaktionszeit bei Verwendung
des gereinigten o-Dianisidins.

Tabelle VIII

mg Glukose per 100 ml	62,5	125	250	500	mg GOD + 0,5 mg POD
50	0,14	0,20	0,10	0,08	Extinktion
100	0,37	0,40	0,88	0,14	
200	0,70	0,80	-	-	
250	0,88	1,00	-	-	
	62,5	125	250	500	mg GOD + 5,0 mg POD
50	0,25	0,27	0,24	0,18	Extinktion
100	0,55	0,54	0,49	0,38	
200	-	0,99	-	-	

Einfluß der Glukose-Oxydase-Konzentration auf die Farb-
entwicklung (0,04 ml Glukoselösung mit steigender Kon-
zentration unter Zusatz von 0,16 ml Äthylalkohol und
2,5 ml Reagens. Inkubationszeit 60 Minuten bei $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
Schicht 1 cm).

Tabelle IX

mg Glukose per 100 ml	0,5	1,0	5,0	10,0	mg POD und 125 mg GOD
25	0,1	0,10	0,12	0,105	Extinktion
50	0,2	0,21	0,27	0,249	
100	0,4	0,44	0,54	0,520	
200	0,8	0,87	0,99	0,960	

Einfluß der Peroxydase-Konzentration auf die Farbentwicklung (0,04 ml Glukoselösung mit steigender Konzentration unter Zusatz von 0,16 ml Äthylalkohol und 2,5 ml Reagens. Inkubationszeit 60 Minuten bei $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Schicht 1 cm).

Tabelle X

HAGEDORN-JENSEN in mg/100 ml	GOD / POD mg/100 ml	HAGEDORN-JENSEN in mg/100 ml	GOD / POD mg/100 ml
168	160	144	123
132	112	94	88
72	56	84	70
210	192	166	148
144	136	126	114
120	96	126	105
154	144	160	158
152	150	124	105
172	148	90	70
108	74	248	193
120	106	160	158
170	101	196	184
156	104	76	70
158	135	190	184
180	145	104	96
130	111	114	98
125	100	180	176
108	90	184	176
90	70	166	154
102	60	76	54
90	53	1056	959
210	144	254	246
224	158	100	96
116	79	258	237
150	115	144	140
290	218	118	105
176	164	190	184
90	84	180	176
168	155	144	132
244	201	126	114
118	100	168	132
78	51	96	60
412	384	90	70
132	128	112	105
132	106	240	237
144	138	168	158
292	240	300	289
354	336	258	246
154	144	82	64
108	64	100	88
102	72	78	72
102	56	238	222
120	96	78	72
330	280	94	80
120	98	144	136
160	158	210	192
72	56	76	56
86	48	168	160
132	112	250	238

Parallelbestimmungen der Blutglukose mit dem Verfahren
nach H a g e d o r n - J e n s e n und der GOD / POD -
Methode.

Tabelle XI

HAGEDORN-JENSEN	GOD / POD	Schnellmethode
250 mg/100 ml	237,6 mg/100 ml	237 mg/100 ml
100 "	94,0 "	95 "
144 "	123,0 "	123 "
100 " Glukoselösung	98,0 "	102 "

Parallelversuche der Methode nach HAGEDORN-JENSEN,
der GOD / POD - und der Schnellmethode.

Tabelle XII

Wellenlänge in m μ	Extinktion	Wellenlänge in m μ	Extinktion
205	0,06	400	0,24
210	0,05	410	0,24
220	0,04	420	0,22
230	0,04	430	0,19
250	0,02	450	0,16
275	0,05	460	0,15
300	0,08	470	0,14
310	0,10	500	0,08
330	0,14	550	0,05
350	0,16	600	0,03
370	0,18	650	0,02
390	0,23		

Absorptionsspektrum des Farbstoffes bei der Schnellmethode
(Spektralphotometer Zeiß-Opton, MQ 4, 1 cm Schichtdicke).

Tabelle XIII

Polarisation	GOD / POD	Polarisation	GOD / POD
0,8	0,7	0,8	0,8
0,4	0,3	1,4	1,3
1,4	0,9	1,8	1,5
4,6	4,1	0,4	1,1
2,8	3,5	1,2	1,1
3,8	3,7	2,9	2,8
3,4	3,7	0,2	0,4
0,8	0,1	1,4	1,4
3,6	3,5	1,0	1,6
1,0	0,7	7,0	7,5

Parallelbestimmungen des Harnzuckers mittels
der Polarisation und der GOD / POD - Methode.

F. Literaturverzeichnis.

=====

- 1.) Maximow, N.A., Ber.d.Bot.Ges. 22 (1904) 225 u. 488.
- 2.) Kostytschew, S., Ber.d.Bot.Ges. 22 (1904) 207.
- 3.) Junitzky, N., Ber.d.Bot.Ges. 22 (1907) 210.
- 4.) Müller, D., Biochem.Z. 199 (1928) 136.
- 5.) Franke, W. u. Lorenz, F., Liebigs Ann. 532 (1937) 1.
- 6.) Franke, W. u. Deffner, M., Liebigs Ann. 541 (1939) 117.
- 7.) Coulthard, C.E., Michaelis, R., Short, W.F., Sykes, G., Skrimshire, G.E.H., Standfast, A.F.B., Birkinshaw, J.H. u. Raistrick, H., Nature, Lond., 150 (1942) 643.
- 8.) Coulthard, C.E., Michaelis, R., Short, W.F., Sykes, G., Skrimshire, G.E.H., Standfast, A.F.B., Birkinshaw, J.H. u. Raistrick, H., Biochem.J. 39 (1945) 24.
- 9.) van Bruggen, J.T., Reithel, F.J., Cain, C.K., Katzmann, P.A., Doisy, E.A., Muir, R.D., Roberts, E.C., Gaby, W.L., Homann, D.M. u. Jones, L.R., J.biol.Chem. 148 (1943) 365.
- 10.) Keilin, D. u. Hartree, E.F., Biochem.J. 42 (1948) 221.
- 11.) Keilin, D., Nature, Lond., 157 (1946) 801.
- 12.) Keilin, D. u. Hartree, E.F., Biochem.J. 503 (1952) 11.
- 13.) Keilin, D. u. Hartree, E.F., Biochem.J. 42 (1948) 230.
- 14.) Hagedorn-Jensen, Biochem.Z. 135 (1923) 46.
- 15.) Hagedorn-Jensen, Biochem.Z. 137 (1923) 92.
- 16.) Lehnartz, Einf.i.d.Chem.Physiologie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1952).
- 17.) Hinsberg-Lang, Medizinische Chemie, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin (1951).
- 18.) Grafe, E. u. Sorgenfrei, H., Dtsch.Arch.klin.Med. 145 (1924) 294.
- 19.) Lohmann, D., Hoppe-Seyler's Z.f.physiol.Chem. 305 (1946).
- 20.) Gey, K.F., Biochem.J. 64 (1956) 145.
- 21.) Pfleiderer, G. u. Greu, L., Biochem.Z. 328 (1957) 499.
- 22.) Benedict, Biochem.Z. 265 (1933) 390 (zit.n.Hinsberg-Lang, Medizinische Chemie, Urban & Schwarzenberg München-Berlin 1951).

- 23.) Folin, O.J., biol.Chem. 82 (1929) 83 (zit.n.Hinsberg-Lang, Medizinische Chemie, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1951).
- 24.) Haslewood u. Strookmann, Biochem.J. 33 (1930) 920 (zit.n. Hinsberg-Lang, Medizinische Chemie, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1951).
- 25.) Holzmann, G., Mc Allister, R.V. u. Niemann, J.biol.Chem. 171 (1947) 27 (zit.n.Hinsberg-Lang, Medizinische Chemie, Urban & Schwarzenberg, Berlin-München 1951).
- 26.) Keston, A.S., Abstracts, ACS.Div.Biol.Chem. (1956) 31 C.
- 27.) Teller, J.D., Abstracts, ACS.Div.Biol.Chem. (1956) 69 C.
- 28.) Huggett, A.St.G. u. Nixon, D.A., Lancet No 6991 (1957) 368.
- 29.) Somogy, M., J.biol.Chem. 86 (1930) 655.
- 30.) Middleton, J.E. u. Griffith, W.J., Brit.Med.J. (1957) 1525.

Herrn Prof. Dr. N. H e n n i n g danke ich
ergebenst für die Überlassung des Themas und die Über-
nahme des Referates.

Herrn Dr. H. S c h ö n danke ich für die freund-
liche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf.

Ich wurde am 13.4.1932 als Sohn des praktischen Arztes Dr. Bruno Bucke und seiner Ehefrau Gerda, geb. Krüger in Bad Kösen/Saale geboren. Von 1936 bis 1940 besuchte ich die Volksschule in Bad Kösen und anschließend das Realgymnasium Walter Flex in Naumburg/Saale, das ich 1950 nach abgelegter Reifeprüfung verließ.

Nach Ablehnung meiner Bewerbungen zum Medizinstudium in der Ostzone verließ ich diese am 16. Oktober 1950 und wurde zum Wintersemester 1950/51 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen immatrikuliert. Nach dem Physikum studierte ich zwei Semester an der Philipps Universität zu Marburg und kehrte dann nach Erlangen zurück, wo ich im Juni 1957 das medizinische Staatsexamen bestand. Seit September 1957 arbeite ich als Medizinalassistent in der Medizinischen Universitäts-Klinik Erlangen.

